



APPLICATIONS DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LA MALADIE RESIDUELLE AU COURS DES LEUCEMIES AIGUËS

Mémoire présenté par

Docteur BENHEDDI maryam

Née le 23 /07/1990 à Fès

Pour l'obtention du Diplôme de Spécialité Médicale en Médecine

Option : Biologie médicale

Rapporteur : TLAMÇANI imane

Session 2021

REMERCIEMENTS

A Mon Maître

Monsieur le Professeur Mustapha MAHMOUD

Permettez-moi cher maitre de vous exprimer mon profond respect et mon dévouement profond, puissions-nous être votre égal tant sur le plan professionnel qu'humain, votre dévotion et votre acharnement, sont l'exemple même du biologiste que nous souhaitons tous devenir.

A Mon Maître

Monsieur le Professeur Moncef AMRANI HASSANI

Je vous remercie pour vos conseils et votre encadrement au cours de mon cursus de résidanat. Veuillez accepter mes remerciements et mon admiration pour vos qualités humaines et professionnelles, j'admire l'étendue de votre savoir, la force de votre engagement et tout l'amour que vous portez pour la discipline.

A Mon Maître

Madame le Professeur Imane TLAMÇANI

Permettez-moi de vous remercier quant à vos efforts et le temps que vous nous avez consacré tant bien humainement parlant que professionnellement, Vos conseils précieux, votre encadrement permanent et vos qualités pédagogiques ont permis la réalisation de ce travail.

Veillez trouver dans ce mémoire, l'expression de ma plus grande estime, mon profond respect et ma sincère gratitude.

A Mes parents

Vous avez guidé mes pas depuis mon enfance, et votre amour pour votre métier a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Je vous remercie pour votre amour et votre soutien inconditionnel sans lesquels ce travail n'aurait pas vu le jour.

Je vous aime très fort.

A mon frère et mes sœurs,

Ces quelques mots ne suffiront jamais à exprimer ma gratitude et tout l'amour que je vous porte. Merci d'être à mes côtés et me soutenir chaque jour que dieu fait.

A mon Mari,

Mon Amour, aucune ébauche de vie n'est à peine imaginable sans toi à mes côtés. Ta présence, ton soutien et ta dévotion font de toi le pilier qui a permis à ce travail de voir le jour et d'accomplir ma carrière professionnelle.

A ma fille Bayane,

*Depuis le jour où tu es entrée dans ma vie, cette dernière
s'est embellie. Tout l'amour que je te porte ne pourraient
être contenues dans ces quelques lignes.*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Fréquence des phénotypes aberrants détectés par cytométrie en flux dans les cancers hématologiques

Tableau II: Panels des anticorps testés pour le phénotypage des leucémies aiguës

Tableau III : Classification immunophénotypique des LAL T selon le groupe EGIL

Tableau IV: Classification immunologique des LAM, certains marqueurs sont caractéristiques des cellules myéloïdes indifférenciées, myélomonocytaire ou granuleuses

Tableau V: Les combinaisons immunophénotypiques utilisées pour l'étude de la MRD dans LAL

Tableau VI: Les combinaisons immunophénotypiques utilisées pour la détection de la MRD dans les LAM

Figure 1 : superposition au scattergram CD45/SSC des cellules exprimant un ou une combinaison d'antigène

Figure 2 : Les différences dans l'expression phénotypique entre LAL et LAM

Figure 3 : Protocole pour la détection de la MRD par CMF

Figure 4: Suivi de la cinétique de disparition de leucémie aiguë par cytométrie en flux

SOMMAIRE

INTRODUCTION	8
« LA CYTOMETRIE EN FLUX : ASPECTS TECHNIQUES »	11
RAPPEL.....	11
1. Principe d'analyse des blastes en cytométrie en flux:.....	13
« APPLICATIONS DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES »	15
1. Apport de l'immunophénotypage par CMF dans le diagnostic des leucémies aigues :.....	16
2. Immunophénotypage des LAL :	18
3. Immunophénotypage des LAM :	21
SUIVI DES LEUCEMIES AIGUES PAR LA CMF : DETECTION DE LA MALADIE RESIDUELLE (MRD).....	23
4. Détection de la maladie résiduelle par la CMF :.....	24
CONCLUSION.....	30
RESUME :	32
REFERENCES :	33

INTRODUCTION

La cytométrie en flux (CMF) est une technique de choix pour quantifier les cellules hématopoïétiques et étudier leur caractéristiques biologiques telle que le niveau de maturation, d'activation ou leurs fonctions, grâce à l'étude d'antigènes cytoplasmiques, d'antigènes de membrane ou du contenu en ARN et en ADN.

Toutes ces nouveautés ont amélioré la capacité à identifier les différentes lignées et les sous-populations cellulaires ainsi qu'à reconnaître les aberrations phénotypiques même celles présentes sur une toute petite partie de la population cellulaire analysée.

L'immunophénotypage par CMF est devenu indispensable pour le diagnostic, le classement et le suivi des hémopathies malignes.

La CMF remplace progressivement, dans les laboratoires d'immuno-hématologie le microscope à fluorescence pour effectuer rapidement des analyses sur un grand nombre de cellules en suspension.

La cytométrie multiparamétrique en flux et les techniques moléculaires (comme la RT-qPCR, Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction), sont les méthodes utilisées pour détecter la maladie résiduelle (MDR) dans les leucémies.

La recherche de la MRD demeure actuellement un élément pronostique primordiale dans le suivi des leucémies aiguës. La littérature a démontré une valeur pronostique d'un seuil de 10^{-3} (une cellule maligne sur mille leucocytes) et qui peut aussi atteindre une sensibilité de l'ordre de 10^{-4} ou 10^{-5} , mais cela dépend de la richesse cellulaire de l'échantillon étudié.

Grâce aux particularités immunophénotypiques, la CMF permet de détecter les cellules anormales et les différencier des cellules normales.

L'objectif de notre travail est de montrer l'intérêt de la CMF dans la détection de la maladie résiduelle dans l'évolution et le suivi des leucémies aiguës. Elle joue un rôle important dans le diagnostic des LAL où elle permet l'identification de la lignée en cause B ou T.

La CMF est la seule technique qui permet de définir des entités rares : LAM0, LAM6, LAM7, et aussi leucémies aiguës biphénotypiques qui sont difficiles à détecter, ainsi que la mise en évidence des expressions aberrantes de certains marqueurs.

La quantification de la maladie résiduelle par CMF apporte en pratique clinique des données prédictives sur l'évolution et le pronostic des patients (rechute ou longue survie).

« LA CYTOMETRIE EN FLUX : ASPECTS TECHNIQUES »

RAPPEL

Les caractéristiques de la CMF qui la distingue des autres techniques sont essentiellement:

- L'analyse quantitative : C'est un avantage majeur par rapport à la microscopie optique courante, de pouvoir quantifier les paramètres observés [1].
- La sensibilité de détection des signaux de fluorescence.
- La vitesse de travail : avec une vitesse moyenne d'analyse de 1000 cellules par seconde, sachant que les appareils modernes peuvent atteindre une analyse de 10000 évènements par seconde sur plusieurs paramètres.
- L'analyse simultanée de plusieurs paramètres : La cytométrie de flux offre la possibilité d'analyser simultanément plusieurs paramètres, tout en mesurant jusqu'à trois paramètres simultanés sur une population lymphocytaire sur le sang ou sur la moelle [2].
- Tri cellulaire : Les cytomètres de haut de gamme permettent de trier et de purifier des populations cellulaires après leur analyse.

Tableau I : Fréquence des phénotypes aberrants détectés par cytométrie en flux dans les cancers hématologiques [3].

<u>Hémopathies malignes</u>	<u>(%) des cas aberrants</u>
Précurseur-B leucémie aigue lymphoblastique	>95%
Lymphocytes T leucémie aigue lymphoblastique	>99%
Leucémie myéloblastique aigue	>75%
Leucémie aigüe biphénotypique	100%
Syndromes lymphoprolifératifs chroniques à cellules B	>95%
Syndromes lymphoprolifératifs chroniques à cellules T	NA
Syndromes lymphoprolifératifs	>40%
Gammapathies monoclonales	>90%
Troubles myélodysplasiques / myéloprolifératifs	NA

1. Principe d'analyse des blastes en cytométrie en flux:

Le Groupe de Travail sur les Leucémies et Lymphomes en Francophonie et le Groupe d'Étude Immunologique des Leucémies a défini le principe d'analyse des blastes en CMF.

L'échantillon est recueilli soit sur moelle osseuse ou sang (prélevés sur tube EDTA).

On travaille soit sur des cellules nucléées isolées, soit sur sang ou moelle totale.

Les suspensions de cellules sont mises par la suite en contact avec des solutions d'anticorps (Ac) couplés à divers fluorochromes.

L'utilisation combinée d'Ac couplés à différents fluorochromes (4 couleurs) permet de séparer les différentes populations cellulaires en cinq clusters après analyse par les faisceaux lasers du cytomètre de flux.

Une couleur spécifique est attribuée à chaque cluster.

Le scattergram FSC/SSC permet d'éliminer les débris cellulaires.

Le scattergram CD45/SSC constitue le masque de référence définissant les régions d'analyse.

L'aire "Bermudes" contient les cellules hématopoïétiques immatures et la population blastique de la majorité des LA [4].

Une fois la population d'intérêt identifiée, on détermine le profil d'expression de divers antigènes à la surface ou dans le cytoplasme des blastes : on superpose au scattergram CD45/SSC les cellules exprimant un ou une combinaison d'antigène (Figure 1).

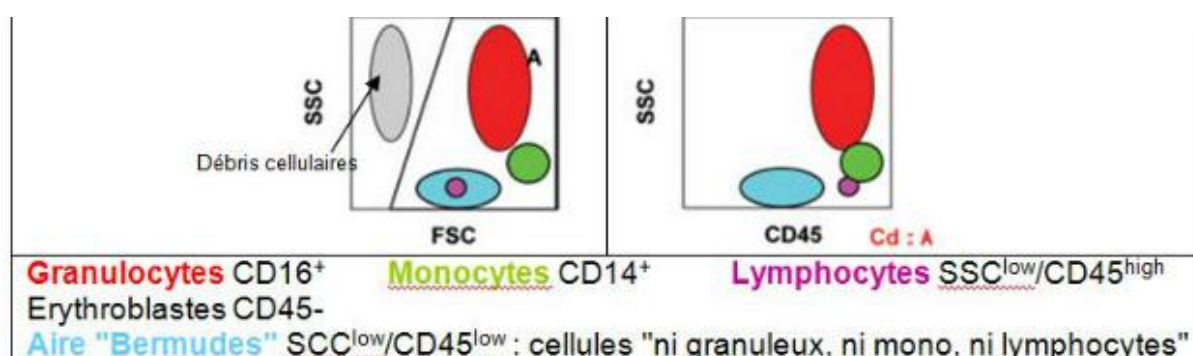


Figure 1 : Superposition au scattergram CD45/SSC des cellules exprimant un ou une combinaison d'antigène [4].

« APPLICATIONS DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES »

La cytométrie en flux est la technique de choix pour la réalisation de l'immunophénotypage des leucémies aiguës.

L'immunophénotypage permet de repérer les cellules anormales, de déterminer leur lignée d'origine et leurs caractéristiques phénotypiques, et d'analyser leur degré d'hétérogénéité.

Cette technique est devenue de routine en hématologie car les cytomètres ont des performances simples et améliorées, grâce à la disponibilité d'une variété d'anticorps couplés à des fluorochromes qui permettent une analyse multiparamétrique [27].

Le diagnostic des leucémies aiguës repose essentiellement sur l'examen cytologique, cytochimique (hémogramme et myélogramme) ainsi que sur l'immunophénotypage qui met en évidence la population blastique [28].

1. Apport de l'immunophénotypage par CMF dans le diagnostic des leucémies aiguës :

L'utilisation de l'anticorps CD45 a permis l'amélioration du repérage des populations cellulaires et surtout blastiques, en facilitant l'interprétation des histogrammes obtenus.

La réalisation de l'immunophénotypage est devenu indispensable pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et myéloïdes (LAM).

Le CD45 est appelé aussi antigène leucocytaire commun, son expression est d'intensité variable selon le degré de maturation des cellules: expression faible sur les

cellules immatures, blastiques, et forte sur les cellules les plus matures des lignées lymphoïde et granulomonocytaire.

A noter que l'antigène CD45 n'est pas exprimé par les érythroblastes ni par les plaquettes.

Brièvement, la moelle est répartie dans une série de tubes, chaque tube contenant un anticorps marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et un anticorps couplé à la phycoérythrine (PE), ainsi que l'anticorps CD45 couplé à la cyanine5 (Cy5).

Les anticorps myéloïdes et lymphoïdes sont regroupés deux à deux ce qui permet de mettre en évidence d'éventuelles coexpressions.

Les marquages intracytoplasmiques sont réalisés de la même façon précédés d'une étape de perméabilisation des cellules.

Le phénotypage sur moelle totale permet de contrôler l'expression des anticorps sur les populations normales résiduelles et d'obtenir aussi un contrôle interne positif et négatif.

A savoir qu'il est possible d'effectuer un immunophénotypage même si le pourcentage de blastes est faible [5].

Il faut tester plus d'un antigène de chaque lignée (lymphoïde B ou T, granulomonocytaire, érythroïde, mégacaryocytaire), car ces derniers ne sont pas réellement spécifiques d'une lignée.

Enfin, les panels proposés par l'EGIL permettent de classer au moins 98 % des leucémies (Tableau II). L'assignement des blastes à une lignée repose sur la positivité

aussi bien que sur la négativité des résultats obtenus avec les différents antigènes testés [5].

Tableau II: Panels des anticorps testés pour le phénotypage des leucémies aiguës [5]

Antigènes d'immaturité	CD34, HLA-DR
Antigènes associés à la lignée lymphoïde T	CD2, CD3c/s, CD5, CD7, CD1, CD4 et CD8
Antigènes associés à la lignée lymphoïde B	CD19, CD22c/s, CD79a c, CD10, CD20, μ c, Igs
Antigènes associés aux lignées granulomonocytaire	CD117, CD33, CD13, MPO, CD15, CD11 b, CDt 4, CD36
Antigènes associés aux lignées érythroïde et mégacaryocytaire	Anti-glyophorine A, CD61, CD41

CD : classe de différenciation ; Ig : immunoglobulines ; c : cytoplasmique ; s : surface.

2. Immunophénotypage des LAL :

L'immunophénotypage reste le seul examen qui permet d'affirmer le caractère lymphoïde ou myéloïde si les blastes ne présentent pas de signes morphologiques de différenciation myéloïde (granulations azurophiles, corps d'Auer, positivité à la MPO), et donc de diagnostiquer une LAL et d'éliminer certaines LAM très peu différenciées (LAM M0) ou LAM plus rares (érythroïde, mégacaryocytaire) [5].

La classification de l'EGIL propose une stadification des phénotypes obtenus dans les LAL B (tableau III) en fonction de la présence ou l'absence du CD10, de la chaîne μ intracytoplasmique, des immunoglobulines (Ig) de surface.

Seules les LAL du groupe B IV ou B matures expriment des Ig de surface.

Ces cellules, qui expriment fortement le CD45, ont les caractéristiques cytologiques des cellules de Burkitt (type LAL 3 du groupe FAB) [6].

Les LAL de nature T représentent environ un quart des cas de LAL chez l'adulte, un peu moins chez l'enfant. Pour le groupe EGIL, les LAL T sont définies par l'expression cytoplasmique et/ou de surface du CD3 [7].

Les phénotypes observés peuvent être classés en différents groupes reproduisant les étapes de la différenciation normale.

Les antigènes CD34 et HLA-DR sont fréquemment exprimés surtout dans les formes les plus immatures décrites comme associées à un mauvais pronostic. De même que les relations entre les phénotypes particuliers et les anomalies cytogénétiques [7].

Dans les LAL la détermination de la lignée B ou T et leur classification en sous groupe fournies par la CMF, demeurent très importantes dans la prise en charge thérapeutique, malgré le fait que certains précurseurs de LAL B ou T montrent des expressions aberrantes de certains Ag qui ne se retrouvent pas dans la maturation normale des cellules lymphoïdes [8].

Tableau III : Classification immunophénotypique des LAL T selon le groupe EGIL [9].

	LAL Pro-T (TI)	LAL Pré-T (TII)	LAL cortical (TIII)	LAL T mature (TIV)
CD7	++	++	++	++
cCD3	++	++	++	++
CD2	+	++	++	++
CD5	-	++	++	++
TCR	-	-	+	++
CD1	-	-	++	-
CD4/CD8	-	+/-	+/-	+/-

- : 10% des leucémies sont positives pour le marqueur ; +/- : 10-25% des leucémies sont positives ; + : 25-75% des leucémies sont positives ; ++ : >75% des leucémies sont positives

N.B : La positivité de cCD3 ou sCD3 suffit pour la classification en lignée T et au moins deux des marqueurs B (CD19 / CD22 / cCD79) sont négatifs et au moins trois des marqueurs myéloïdes (CD13, CD33, CD117, MPO) sont négatifs [9].

3. Immunophénotypage des LAM :

Concerant les LAM l'immunophénotypage n'est pas aussi indispensable pour le diagnostic que celui des LAL, parceque les sous types leucémiques définis par le groupe FAB sont les mêmes que les sous-groupes phénotypiques de l'EGIL (Tableau IV).

L'immunophénotypage par CMF permet aussi de distinguer les LAM4/LAM5 à différenciation monocyttaire des LAM2/LAM3 à différenciation granulocytaire. Il permet de mettre en évidence des blastes, montrer la différenciation granuleuse ou monocyttaire et associer directement les données morphologiques et celles immunologiques.

Certaines LAM ne peuvent être détectées que par immunophénotypage: des LAM0, de certaines LAM6 et des LAM7.

Les LAM0, qui représentent moins de 5% des cas et essentiellement chez l'adulte, expriment un ou plusieurs antigènes myéloïdes, mais les antigènes de maturation comme CD15, CD65, CD14, CD11b sont moins exprimés.

Les antigènes lymphoïdes restreints CD3, CD79a, CD22, même cytoplasmiques, sont absents et éliminent une LA biphénotypique.

Les LAM6 sont des formes rares de LAM purement érythroblastiques caractérisées par la prolifération de blastes indifférenciées au cytoplasme souvent basophile. Le phénotypage montre l'expression du CD36, de la glyophorine A, voire de l'hémoglobine A, alors que les autres marqueurs myéloïdes, le HLA-DR, le CD34 et les marqueurs lymphoïdes B et T sont aussi négatifs [9].

Les antigènes mégacaryocytaires ne sont pas exprimés dans les formes typiques.

Les LAM7 sont aussi des formes rares (3 à 5 %). Le phénotypage visualise l'origine mégacaryocytaire des blastes de morphologie indifférenciée en montrant l'expression des glycoprotéines plaquettaires CD41, CD61, +/- CD42 alors que les antigènes myéloïdes CD13 et CD33 ont une expression variable selon les cas [9].

L'anti-MPO, les antigènes HLA-DR et CD34 sont absents.

Tableau IV: Classification immunologique des LAM, certains marqueurs sont caractéristiques des cellules myéloïdes indifférenciées, myélomonocytaire ou granuleuses [9].

	LAM0/M1/M2	LAM3	LAM4/M5a/M5b	LAM6	LAM7
CD13	+/-/+/+/+	++	+/+/+/+/+	+	++
CD33	+/-/+/+/+	++	+/+/+/+/+	+	+/-
cMPO	-/+/+/+	++	+/+/+/+/+	+	-
CD14	-/-/-	-	+/+/+/+	-	-
CD36	-/-/-	-	+/+/+	++	+
CD117	+/+/+/+/+	+	+/+/+	+	+
CD41/42/61	-/-/-	-	-/-/-	-	++
CD15	+/+/-/-/+/+	+/-	-/-/-	-	-
HLA-DR	+/+/+/+	-	+/+/+/+/+	+	++

- : 10% des leucémies sont positives pour le marqueur ; +/- : 10-25% des leucémies sont positives ; + : 25-75% des leucémies sont positives ; ++ : >75% des leucémies sont positives.

SUIVI DES LEUCEMIES AIGUES PAR LA CMF : DETECTION DE LA MALADIE RESIDUELLE (MRD)

La maladie résiduelle (MRD : minimal residual disease) est définie par la présence d'un contingent de cellules tumorales qui persiste après traitement des leucémies aiguës et explique en grande partie les rechutes par la prolifération de ces clones malins.

Ces derniers restent indétectables par les techniques conventionnelles, il est important de pouvoir déterminer de façon sensible cette masse tumorale résiduelle, car l'évolution ultérieure de la maladie est directement dépendante de ce paramètre.

Au diagnostic d'une leucémie, le nombre des cellules blastiques est compris entre 10^{11} et 10^{12} , après traitement, un patient est considéré en rémission complète morphologique lorsqu'il persiste moins de 5% d'éléments blastique dans sa moelle, même dans ces conditions, on retrouve encore jusqu'à 10^{10} des cellules tumorales non détectées par l'examen morphologique [10].

La recherche de la MRD est devenue un élément de pronostic important dans les LA, puisqu'elle permet de suivre l'évolution de la masse tumorale et d'apprécier la sensibilité des cellules leucémiques aux traitements en évaluant la qualité de la rémission complète. Elle constitue de ce fait un paramètre de pronostic puissant et permet d'orienter la thérapeutique [11,12].

4. Détection de la maladie résiduelle par la CMF :

La détection de la MRD est une étape importante dans le suivi des leucémies aiguës. La CMF permet de repérer des populations en très faible quantité avec des sensibilités le plus souvent inférieures à 0.01% [7].

On ne peut atteindre cette sensibilité qu'avec des précautions: fenêtrage optimal des blastes, étude multiparamétrique à la recherche de phénotypes aberrants associés aux cellules leucémiques et l'analyse d'un nombre suffisant de cellules [13].

Ces phénotypes aberrants (exemple CD34+ CD56+ ou CD34- CD117+ CD15+ pour des blastes myéloïdes, CD34+ CD22+ CD20- ou CD34+ CD19+ CD13+ pour des blastes lymphoïdes B, CD34+ CD3+ ou TdT+ CD3+ pour des blastes lymphoïdes T sont très fréquents, aussi bien dans les LAM que dans les LAL et permettent une quantification rapide de la MRD (figure 2) [14,15].

Dans le suivi des leucémies aiguës, la CMF peut quantifier avec précision les cellules leucémiques résiduelles, de distinguer les cellules apoptotiques et de fournir un aperçu sur l'état des cellules hématopoïétiques normales dans l'échantillon [16].

La stratégie de la détection de la MRD est parfois limitée, certaines LA ne présentant pas la combinaison antigénique spécifique permettant de les différencier d'une sous-population cellulaire normale. De plus, des changements dans le phénotype des cellules leucémiques peuvent apparaître au moment de la rechute, que ce soit dans les LAL, ou plus fréquemment dans les LAM [7].

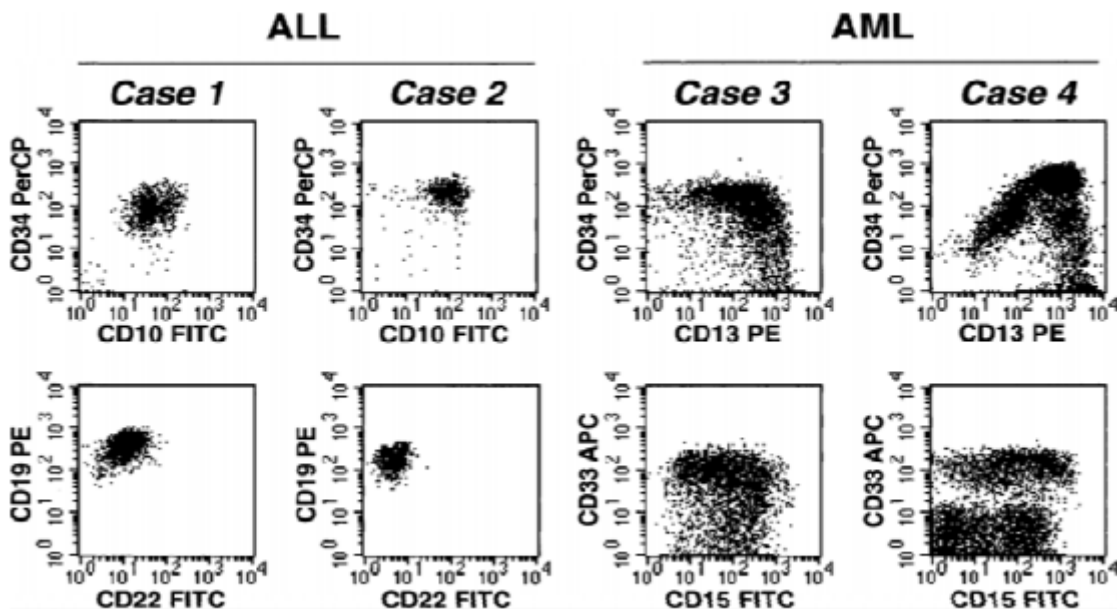


Figure 2: Les différences dans l'expression phénotypique entre LAL et LAM [20].

L'identification des cellules leucémiques résiduelles par CMF repose sur la mise en évidence de leurs caractéristiques phénotypiques, ceci en utilisant des combinaisons immunophénotypiques [17].

Les cellules leucémiques peuvent exprimer des marqueurs normaux de différenciation ou exprimer des marqueurs aberrants. Ces caractéristiques correspondantes aux profils immunophénotypiques associés aux leucémies ou LAIP (Leukemia associated immunophenotypic patterns) pour suivre la MRD, il suffit de rechercher les cellules présentant un LAIP [18].

Dans les LAM, les cellules présentant un LAIP ont une fréquence de 10^{-4} , qui est compatible avec la sensibilité pour la détection de la MRD. Actuellement, l'utilisation de plusieurs combinaisons d'AC a permis de définir un seuil pronostique de 10^{-3} (figure 3) .

L'utilisation de la PCR est plus préconisée dans le cas des LAM [19].

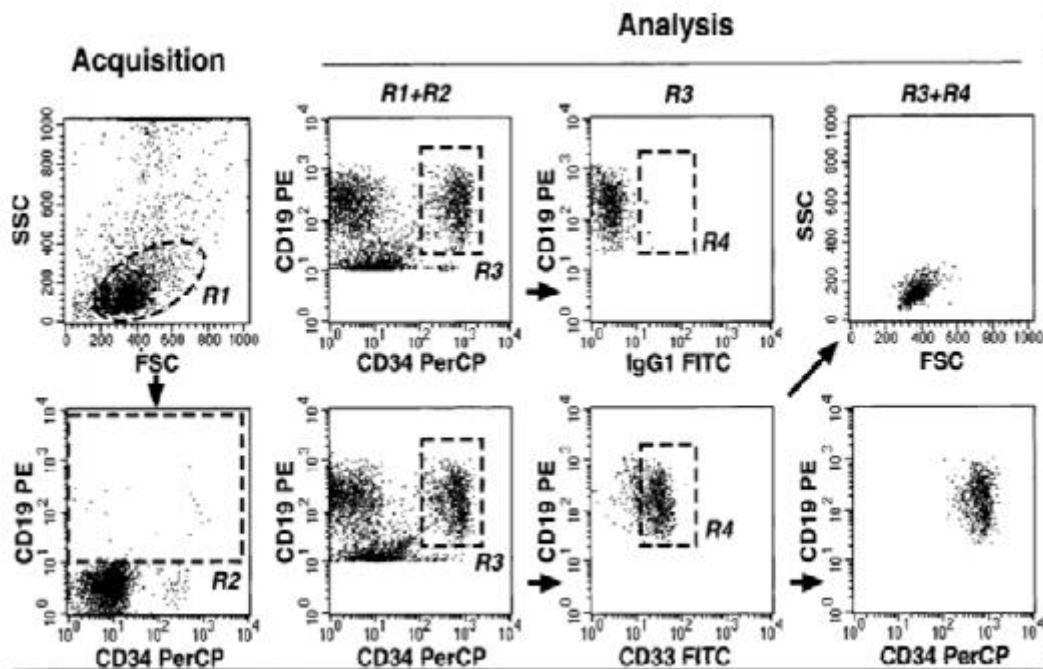


Figure 3 : Protocole pour la détection de la MRD par CMF [20].

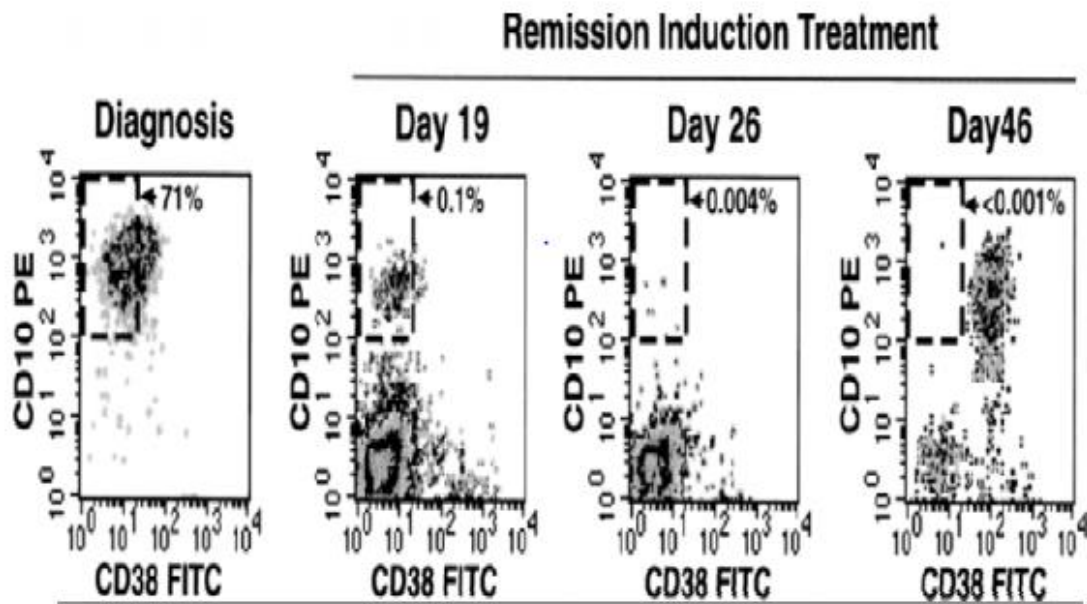


Figure 4: Suivi de la cinétique de disparition de leucémie aiguë par cytométrie en flux [20].

Dans les LA, la recherche de la maladie résiduelle doit être un examen qui entre dans les stratégies de prise en charge thérapeutique. Le seuil de 10^{-2} cellules malignes constitue un facteur de mauvais pronostic [19].

Tableau V: Les combinaisons immunophénotypiques utilisées pour l'étude de la MRD dans LAL [21].

LAL	Phénotypes	Fréquence (%)
Lignée B	CD19/CD34/CD10/TdT	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD22	20-30
	CD19/CD34/CD10/CD38	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD45	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD13	10-20
	CD19/CD34/CD10/CD15	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD33	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD65	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD21	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD56	5-10
	CD19/CD34/CD10/KORSA3544	10-20
	CD19/CD34/TdT/cytoplasmic μ	10-20
	CD19/7.1	3-5
	CD19/p53	3-5
Lignée T	TdT/CD3	90-95
	CD34/CD3	30-50

Tableau VI: Les combinaisons immunophénotypiques utilisées pour la détection de la MRD dans les LAM [21].

Phénotypes	Fréquence (%)
CD13/CD33/CD34/CD11b	10-15
CD13/CD33/CD34/CD65	10-20
CD13/CD33/CD34/CD15	10-20
CD13/CD33/CD34/CD56	10-15
CD13/CD33/CD34/CD38	10-15
CD33/CD34/CD117/CD13	20-40
CD33/CD34/CD117/CD15	20-40
CD33/CD34/CD117/HLA-DR	10-15
CD33/CD34/CD117/CD11b	10-20
CD13/CD33/CD34/CD19	5-10
CD13/CD33/CD34/CD2	5-10
CD13/CD33/CD34/CD7	10-20

CONCLUSION

En raison de son intérêt clinique et des informations déterminantes qu'elle apporte, la CMF a été massivement développée et s'est imposée comme une méthode de diagnostic utilisé en routine hématologique.

Le phénotypage par la CMF est devenu un élément indispensable au diagnostic et au suivi des leucémies aiguës.

L'introduction du marqueur CD45 a été un progrès assez considérable, notamment dans l'étude des LAM, pour améliorer le repérage des blastes et analyser les éléments myéloïdes plus différenciés. La CMF peut être également utilisé pour suivre l'évolution des patients sous traitement.

L'étude de la maladie résiduelle, évaluée sur la présence de blastes au phénotype aberrant, sera un des éléments importants pris en compte dans l'élaboration des futurs protocoles thérapeutiques. Cette revue de la littérature doit être suivie par d'autres études pour prouver le rôle primordial de la CMF dans la classification, pronostic, diagnostic, et le suivi des leucémies aiguës dans notre contexte.

RESUME :

La cytométrie en flux (CMF) est une technique quantitative et très sensible. Elle s'adapte à l'analyse des populations cellulaires complexes. Elle joue un rôle important dans le diagnostic des LAL où elle permet l'identification de la lignée en cause B ou T.

La CMF est la seule technique qui permet de définir des entités rares : LAM0, LAM6, LAM7, et aussi leucémies aiguës biphénotypiques qui sont difficiles à détecter, ainsi que la mise en évidence des expressions aberrantes de certains marqueurs.

La quantification de la maladie résiduelle par CMF apporte en pratique clinique des données prédictives sur l'évolution et le pronostic des patients (rechute ou longue survie).

L'objectif de notre travail est de montrer l'intérêt de la CMF dans la détection de la maladie résiduelle dans l'évolution et le suivi des leucémies aiguës.

Mots clés : Cytométrie en flux– Leucémie aiguë– Diagnostic– Maladie résiduelle

REFERENCES :

- [1] Lizard G et al. Microbilles, nanobilles et cytométrie : application à l'analyse et à la purification cellulaire et moléculaire. Pathologie Biologie 2003; 51: 418–427.
- [2] LEES O. Immunophénotypage: apport de la cytométrie en flux à la biologie clinique. Revue Française des Laboratoires ; 2000 ; 327 : 91–103.
- [3] S. Wulff. Guide to flow cytometry/ 2nd Edition Dako 2006.
- [4] Arnoulet C., Béné MC. et al : Four- and five- color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow : a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. Clinical Cytometry, 2010;78B:3–10.
- [5] Helene Jouault. Place de la cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. Revue Française des Laboratoires (Elsevier Paris), juin 2002, N° 344.
- [6] Han X, Bueso-Ramos CE. Advances in the pathological diagnosis and biology of acute lymphoblastic leukemia: Annals of Diagnostic Pathology 2005; 9: 239–257.
- [7] Omar Abdelkader M, Matar M, Meabed M. Expression of the C-KIT Molecule in Acute Myeloid Leukemias: Implications of the Immunophenotypes CD117 and CD15 in the Detection of minimal Residual Disease. Journal of the Egyptian Nat.Cancer Inst.2001: Vol.13, No.3: 191–201p.
- [8] Laboratoire Pasteur Cerba. Guide des analyses spécialisées, 5ème édition. (Elsevier Masson) 2007. P: 616.
- [9] Vincenot A, Abarah W, Frayfer J, Mahfouz I, Andre-Kerneis E. Leucémie aiguë myéloïde avec érythroblastose médullaire : à propos d'un cas illustrant la nouvelle classification OMS (2008). Ann Biol Clin 2011.
- [10] Venditti A, Maurillo L. « Pretransplant minimal residual disease level predicts clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia receiving high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. Leukemia 2003; 17 (11) – 2178–82.

- [11] Malecki M, Sanchez-Irizarry C. « leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes » *Mol Cell Biol* 2006; 26(12):4642–51.
- [12] Gokbuget N, Hoelzer D. Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Hematology* 2009, Vol 46, No 1, pp. 64–75 ; 69 (3) : 343–7.
- [15] Nam Koh K, Park M, Kim BK, Joon Im H, Park C.J, Jang S, Sook Chi H, Seo JJ. Prognostic significance of minimal residual disease detected by a simplified flow Cytometric assay during remission induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Korean J Pediatric* 2010; 53(11):957–964.
- [13] Helene Jouault. Place de la cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguë. *Revue Française des Laboratoires* (Elsevier Paris), juin 2002, N° 344.
- [14] Michalek J, Smarda J Acute Myeloid Leukemia: Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *SCRIPTA MEDICA (BRNO)*, Octobre 2000: 73 (4): 223–228.
- [16] Elaine DS; Smith C, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Campana D. Minimal Residual Disease Quantification in Acute Myeloid Leukemia: *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009; 9(Suppl 3): S281–S285.
- [17] Bene MC. Immunophenotyping of acute leukemias: *Immunol Lett* 2005: 98 (1): 9–21.
- [18] Obro NF, Ryder LP, Madsen HO, Andersen MK, Lausen B, Hasle H, Schmiegelow K, Marquart HV. Identification of residual leukemic cells by flow cytometry in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia verification of leukemic state by flow-sorting and molecular/cytogenetic methods: *Haematol*. 2011/ 10.3324.
- [19] Campana D. Status of Minimal Residual Disease Testing in Childhood Hematological Malignancies: *Br J Hematol* 2008: 143(4):481–9.
- [20] Campana D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: *Semin Hematol* 2009: 46(1): 100–106.

- [21] Unal S, Cetin M. The prognostic impact of myeloid antigen expression in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients: Turk J pediatric 2011; 50(6):533-6